

研究论文

氧化应激和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II参与 β 肾上腺素受体持久激动引起的大鼠心肌肥厚

刘艳丽, 刘奔[#], 屈扬扬[#], 柴慧娟, 李锐, 张玲^{*}

天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 天津 300070

摘要: 持久激动 β 肾上腺素受体(β adrenergic receptor, β AR)可导致病理性心肌肥厚, 但其机制尚不明确。本研究观察抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌肥厚大鼠的心肌氧化应激水平及钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)表达的影响, 探讨 β AR持久激动诱发心肌肥厚机制中CaMKII和氧化应激的作用。健康雄性Wistar大鼠, 随机分成4组: 正常对照组(CTRL), ISO处理组(ISO), 正常NAC组(CTRL+NAC)和ISO处理+NAC组(ISO+NAC), 每组6只。ISO及ISO+NAC组动物每天腹腔注射3 mg/kg ISO, CTRL及CTRL+NAC组腹腔注射相同体积的生理盐水; CTRL+NAC及ISO+NAC组动物每日自由饮用含15 g/L NAC的饮用水。每周用无创动脉血压仪检测鼠尾动脉血压, 连续2周; 以心重指数(HW/BW)和左心室组织HE染色检测心肌肥厚情况; 荧光测定法检测心肌线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; Western blot检测左室心肌NADPH氧化酶4 (NADPH oxidase 4, NOX₄)以及有活性的CaMKII (p-CaMKII/CaMKII)的表达变化。结果显示, 与CTRL组相比, ISO组大鼠出现明显的心肌肥厚, 心肌线粒体ROS水平升高($P < 0.05$), 心肌组织NOX₄和p-CaMKII的表达均显著增加(分别为CTRL组的1.4倍和1.6倍, $P < 0.05$); NAC显著改善了ISO诱导的心肌肥厚, 降低了ISO诱导的心肌线粒体ROS过度生成($P < 0.05$ vs ISO), 有效抑制了ISO诱发的NOX₄及p-CaMKII表达上调($P < 0.05$ vs ISO); CTRL+NAC组各项指标与CTRL组大鼠无差异; 各组动物尾动脉血压亦无显著性差异。上述结果提示, 氧化应激和CaMKII在 β AR持久兴奋诱发心肌肥厚机制中起重要作用, NAC可以通过抑制心肌细胞线粒体及NADPH氧化酶应激途径降低氧化应激水平, 抑制CaMKII激活, 从而改善 β AR持久激动引起的心肌肥厚。

关键词: 氧化应激; 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II; β 肾上腺素受体; 心肌肥厚

中图分类号: R331.3; Q463

Oxidative stress and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contribute to the development of sustained β adrenergic receptor-stimulated cardiac hypertrophy in rats

LIU Yan-Li, LIU Ben[#], QU Yang-Yang[#], CHAI Hui-Juan, LI Rui, ZHANG Ling^{*}

Department of Physiology and Pathophysiology, Basic Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Sustained activation of β adrenergic receptor (β AR) leads to pathologic cardiac hypertrophy. However, the related mechanisms still remain unclear. In this study, we observe how *N*-acetylcysteine (NAC) affects the oxidative stress and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) expression in heart of isoproterenol (ISO)-stimulated rats, and investigate whether oxidative stress and CaMKII contribute to the development of sustained β AR-stimulated cardiac hypertrophy. Healthy male Wistar rats were randomly separated into 4 groups: control (CTRL), ISO-treated (ISO), control with NAC supplement (CTRL+NAC) and ISO-treated

Received 2012-05-11 Accepted 2012-06-06

This work was supported by High School Science and Technology Fund Planning Project of Tianjin Municipality, China (No. 20060206) and the Scientific Research Fund of Tianjin Medical University, China (No. 2011ky33).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-22-23542522; E-mail: zhanglsl@tjmu.edu.cn

with NAC supplement (ISO+NAC) groups (6 rats in each group). Systolic blood pressure (SBP) was measured in awake rats with the tail-cuff method every week for two weeks. Heart weight/body weight ratio (HW/BW) and HE staining were used for the detection of myocardial hypertrophy. Myocardial mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels were measured by DCF fluorometry. The expressions of activated-CaMKII (p-CaMKII/CaMKII) and NADPH oxidase 4 (NOX₄) were determined by Western blot analysis. The results showed that ISO-treated (i.p., daily 3 mg/kg, 2 weeks) rats developed an obvious cardiac hypertrophy as expressed by increases of HW/BW and myocyte cross-section area. Cardiac mitochondrial ROS level was significantly enhanced in ISO group as compared to CTRL group ($P < 0.05$). The expressions of NOX₄ and p-CaMKII in ISO group were also up-regulated as compared to CTRL group (1.4 and 1.6 times of CTRL, respectively, $P < 0.05$). NAC supplement significantly suppressed the hypertrophic development of heart in ISO-stimulated rats. The cardiac mitochondrial ROS level showed a significant decrease in rats of ISO+NAC group ($P < 0.05$ vs ISO). In accordance with this, ISO+NAC group rats also showed marked reductions in the expressions of NOX₄ and p-CaMKII/CaMKII compared to ISO group rats ($P < 0.05$). There were no significant differences of the detected indices between the rats from CTRL+NAC and CTRL groups. SBP showed no differences among four groups. These results suggest that both oxidative stress and CaMKII play important roles in sustained β AR-stimulated cardiac hypertrophy. NAC may suppress ISO-induced cardiac hypertrophy by down-regulating the expression of activated-CaMKII, and by reducing the level of oxidative stress originated from mitochondria and NADPH oxidase pathways.

Key words: oxidative stress; calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; β adrenergic receptor; cardiac hypertrophy

心脏疾病常常伴有交感神经系统过度激活和循环系统内儿茶酚胺水平的增高, 持久激动 β 肾上腺素受体 (β adrenergic receptor, β AR) 可以导致心肌肥厚, 但其机制尚不明确。钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 是 β AR 下游已知的靶信号, 其活性和表达在心肌肥厚患者及多种心肌肥厚动物模型的心脏组织中均有明显增加^[1]。氧化应激信号活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 与病理性心肌肥厚和心衰的发生发展密切相关^[2], 但在 β AR 介导心肌肥厚机制中的作用仍不明确。最近研究表明血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 可以通过 ROS 氧化 M281/282 位点激活 CaMKII^[3]。我们推测 CaMKII 与 ROS 在持久激动 β AR 诱发心肌肥厚的机制中起重要作用, 二者可能具有一定相关性。本研究应用含巯基的抗氧化物 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 对异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的心肌肥厚大鼠进行实验性抗氧化治疗, 观察其对大鼠心肌肥厚的组织学、心肌氧化应激水平及 CaMKII 表达的影响, 旨在探讨持久激动 β AR 诱发心肌肥厚机制中 CaMKII 和氧化应激的作用及相关性, 寻找防治病理性心肌肥厚的新靶点。

1 材料和方法

1.1 试剂 健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180~200 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。ISO 购自上海禾丰制药有限公司; NAC 和裂解液中各试剂、

二氯荧光素双醋酸盐 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均购自 Sigma 公司; 抗 p-CaMKII (Thr286) 和 GAPDH 抗体购 Cell Signaling Technology; 抗 CaMKII 抗体购自 BD Transduction Laboratories™; 抗 NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX₄) 抗体购自 Novus Biological 公司; 辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体购自 Jackson 公司, Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL) 购自 Millipore 公司。

1.2 动物模型建立、分组及标本采集 大鼠随机分成 4 组: 正常对照组 (CTRL), ISO 处理组 (ISO), 正常 NAC 组 (CTRL+NAC) 和 ISO 处理+NAC 组 (ISO+NAC), 每组 6 只。ISO 及 ISO+NAC 组动物每天腹腔注射 3 mg/kg ISO, CTRL 及 CTRL+NAC 组腹腔注射相同体积的生理盐水; CTRL+NAC 及 ISO+NAC 组动物每日自由饮用含 15 g/L NAC 的饮用水。上述处理连续 2 周, 于第 2 周末次给药后大鼠禁食 12 h, 称体重 (body weight, BW), 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉后放血处死大鼠, 开胸取心脏组织, 去除大血管及心外膜脂肪组织, 用预冷的生理盐水清洗干净后滤纸吸干, 称全心重量 (heart weight, HW), 计算心重指数 (HW/BW)。分离左心室, 进行心肌线粒体 ROS 荧光测定; 部分组织投入 10% 中性福尔马林固定液中固定, 用于组织学研究; 部分组织液氮速冻后转移至 -80 °C 保存, 用于 Western blot 检测。

1.3 鼠尾动脉血压测量 采用 BP-6 动物无创血压测量仪 (成都泰盟科技公司) 测定鼠尾动脉血压。于

实验前连续3天训练使大鼠熟悉测定过程。分别于实验前一天, 实验第一周末、实验第二周末清晨测定清醒大鼠尾动脉血压3次, 取其平均值进行组间比较。

1.4 HE染色检测心肌的组织学变化 10%中性福尔马林固定左心室组织, 经乙醇梯度脱水, 常规石蜡包埋, 石蜡切片(6 μ m)做HE染色。于显微镜下(VH8000, VH-S10/S11)放大200倍拍照。每张切片随机选取10个视野, 每个视野选10个心肌细胞(要求尽量呈圆形), 用图像分析软件IPP6.0测量其横截面积, 计算平均值。

1.5 心肌线粒体ROS水平检测 采用差速分级离心法分离线粒体^[4], 新鲜的心肌组织用心肌提取介质(0.25 mol/L sucrose, 3.0 mmol/L HEPES, 0.5 mmol/L EDTA, pH 7.4)冲洗干净后剪碎, 加入5 mL 介质, 电动匀浆器900转/min匀浆。4 $^{\circ}$ C, 800 g离心10 min, 弃沉淀, 上清于10 000 g离心10 min, 去上清, 沉淀用5 mL提取介质悬浮, 10 000 g离心10 min, 最后沉淀用0.5 mL介质悬浮, 以上操作都在冰浴中进行。考马斯亮蓝法测定线粒体蛋白含量。根据聂金雷等^[5]的方法检测线粒体ROS水平, 取0.5 mg线粒体蛋白, 加入测定介质(130 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 20 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L glucose, pH 7.4)中, 用DCFH-DA作为荧光探针(激发波长499 nm, 发射波长521 nm), 于37 $^{\circ}$ C测定以苹果酸和谷氨酸为底物启动线粒体呼吸时的ROS生成速率。

1.6 Western blot检测心肌NOX₄和p-CaMKII的表达 冻存的心肌组织加NP40裂解液(137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris pH 7.4, 1% NP40, 20% glycerol, 10 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mmol/L NaF, 2.5 μ g/mL aprotinin, 2.5 μ g/mL leupeptin, phosphatase inhibitor cocktail-1), 4 $^{\circ}$ C下匀浆, 冰上裂解15 min, 离心(4 $^{\circ}$ C、17 500 r/min) 30 min, 取上清, BCA法测蛋白浓度。等量蛋白(150 μ g)于10% SDS-PAGE电泳分离后, 电转至PVDF膜, 5%脱脂牛奶37 $^{\circ}$ C封闭1 h, 分别加入抗p-CaMKII (1:1 000)、抗CaMKII (1:2 000)、抗NOX₄ (1:680)及抗GAPDH (1:5 000)抗体, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗涤10 min $\times$ 3次, 用含辣根过氧化物酶(HRP)标记的相应二抗(1:5 000)孵育60 min, 洗膜10 min $\times$ 3次, ECL孵育5 min后曝光。凝胶成像分析系统进行密度扫描并分析。

1.7 统计学方法 数据以mean $\pm$ SEM表示; 均数

组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异; 统计分析均使用SPSS16.0软件。

2 结果

2.1 各组大鼠血压的变化

各组大鼠在实验过程中状态良好, 尾动脉血压在组间无显著性差异(图1)。

2.2 HW/BW变化

ISO给药两周后大鼠体重较CTRL组大鼠无明显变化, 故以HW/BW作为检测心肌肥厚情况指标之一。ISO处理组大鼠HW/BW明显高于CTRL组 [(4.23 $\pm$ 0.19) mg/g vs (2.82 $\pm$ 0.04) mg/g, $P < 0.05$], NAC显著降低了ISO诱导的HW/BW增加 [(3.54 $\pm$ 0.10) mg/g, $P < 0.05$ vs ISO]; CTRL+NAC与CTRL组相比, HW/BW无显著差异(图2)。

2.3 心肌组织学及心肌细胞横截面积变化

HE染色显示, 与CTRL组相比, ISO组心肌出现明显肥厚(图3A), 心肌细胞横截面积明显增大 [(1 422.40 $\pm$ 48.35) μ m² vs (784.30 $\pm$ 22.08) μ m², $P < 0.05$], 与ISO组相比, ISO+NAC组心肌肥厚显著减轻, 心肌细胞横截面积明显减小 [(994.90 $\pm$ 48.03) μ m², $P < 0.05$]; CTRL+NAC与CTRL组的心肌细胞横截面积间未发现显著差异(图3B)。

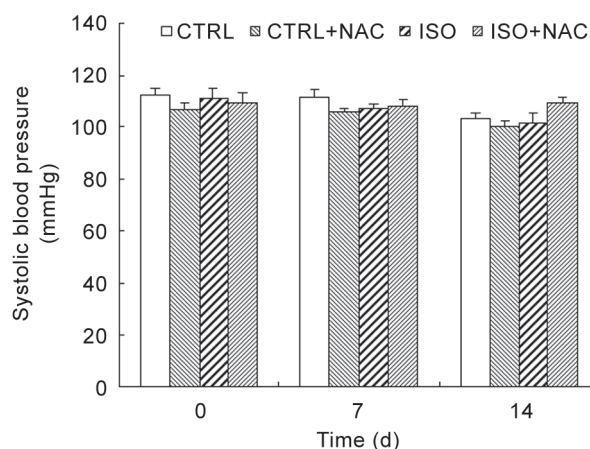


图1. ISO给药前、给药第7天及给药第14天四组大鼠尾动脉收缩压的变化

Fig. 1. Systolic blood pressure (SBP) in four groups of rats measured by tail cuff method at three time points: before experiment, 7 days after the beginning of experiment and 14 days after the beginning of experiment. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$). There was no significant difference of SBP among the four groups.

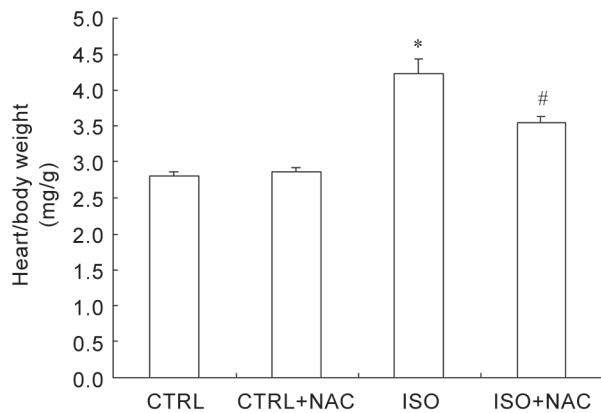


图 2. 四组大鼠心重指数(HW/BW)比较

Fig. 2. Heart weight index (HWI) of 4 groups of rats expressed as the ratio of HW/BW. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$), * $P < 0.05$ vs CTRL; # $P < 0.05$ vs ISO.

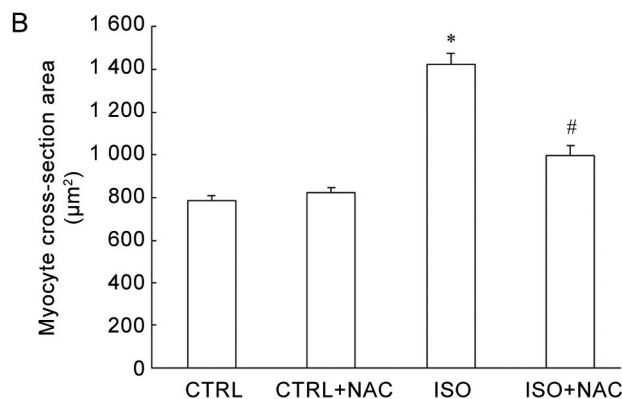
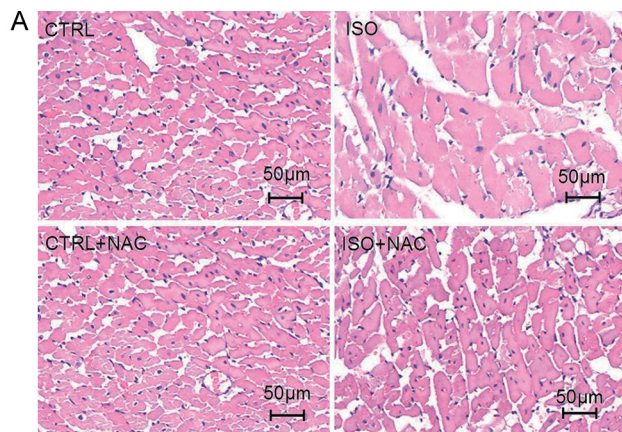


图 3. 四组大鼠心肌组织学及心肌细胞横截面积变化

Fig. 3. Cardiac histology and myocyte cross-section area in 4 groups of rats detected by HE staining. A: HE staining results of left ventricular cardiac tissues. Scale bar, 50 μ m. B: The myocyte cross-section area was calculated from the HE staining figure using an image analysis software IPP6.0. Data were averaged from 10 cells per detected field and 10 detected fields per section for every rat. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs CTRL; # $P < 0.05$ vs ISO.

2.4 心肌线粒体ROS水平变化

以 DCFH-DA 为探针检测线粒体 ROS, 结果显示被 ROS 氧化的氧化型二氯荧光素 (DCF) 荧光强度随时间呈线性增加, 表明来源于线粒体的 ROS 以恒定速率产生。如图 4 所示, ISO 组大鼠心肌线粒体 ROS 生成较 CTRL 组显著增加 (0.50 ± 0.04 vs 0.26 ± 0.02 , $P < 0.05$), NAC 明显降低了 ISO 诱导的 ROS 生成 (0.27 ± 0.01 , $P < 0.05$ vs ISO)。CTRL+NAC 与 CTRL 组相比, ROS 水平无差异。

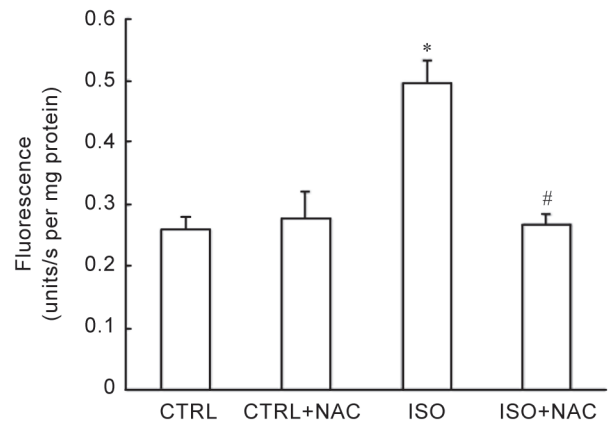


图 4. DCF 荧光测定法检测四组大鼠心肌线粒体 ROS 水平

Fig. 4. ROS production in mitochondria of cardiac cells in 4 groups of rats measured by DCF fluorescence spectrophotometric method. Data were expressed as fluorescence units per second per mg protein. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs CTRL; # $P < 0.05$ vs ISO.

2.5 心肌NOX₄和p-CaMKII的表达变化

ISO 组心肌组织中 NOX₄ 表达较 CTRL 组显著增加 (为 CTRL 组的 1.4 倍, $P < 0.05$), NAC 明显降低了 ISO 诱导的 NOX₄ 表达增加 ($P < 0.05$ vs ISO) (图 5); 与此相一致, ISO 组心肌有活性的 CaMKII 表达 (p-CaMKII/CaMKII) 较 CTRL 组显著增加 (为 CTRL 组的 1.6 倍, $P < 0.05$), NAC 明显降低了其表达增加 ($P < 0.05$ vs ISO) (图 6)。CTRL+NAC 与 CTRL 组相比, NOX₄ 及 p-CaMKII/CaMKII 均无差异 (图 5 和图 6)。

3 讨论

心肌肥厚是多种心血管疾病共同的病理转归, 长期的心肌肥厚可增加心肌耗氧量、降低心肌顺应性, 最终导致心力衰竭并增加猝死发生率^[6]。因而, 深入了解心肌肥厚发生发展的确切机制, 探讨干预

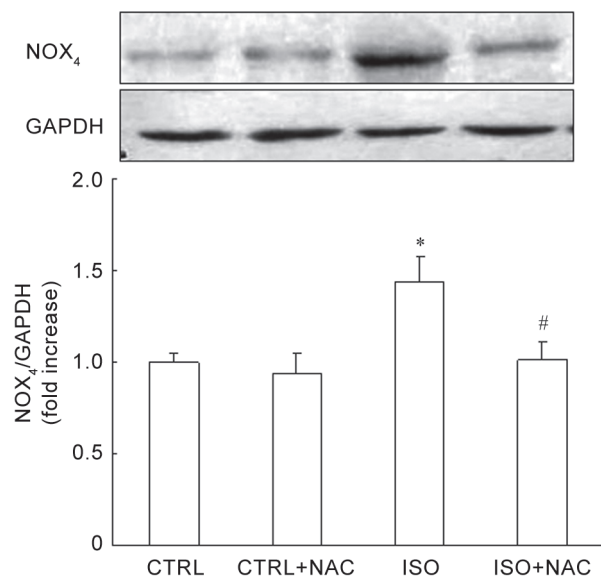


图 5. 四组大鼠心肌NOX₄蛋白表达水平

Fig. 5. Expression of cardiac NOX₄ in 4 groups of rats. GAPDH was blotted as the internal control. Data were expressed as fold increase of NOX₄/GAPDH over CTRL animals. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs CTRL; # $P < 0.05$ vs ISO.

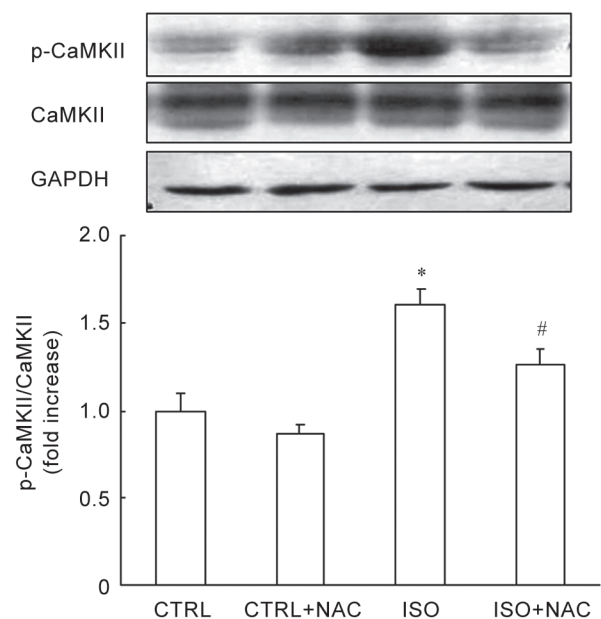


图 6. 四组大鼠心肌p-CaMKII/CaMKII表达

Fig. 6. Expression of cardiac p-CaMKII and total CaMKII in 4 groups of rats. GAPDH was blotted as internal control. Total CaMKII showed a constant expression among the four groups. The CaMKII activation was quantified as the ratio of density of p-CaMKII band compared with total CaMKII band, and expressed as fold increase over CTRL animals. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs CTRL; # $P < 0.05$ vs ISO.

的可能性，成为心血管研究领域的重要课题。

心肌肥厚是由多种神经体液因素诱导、体内多种细胞信号转导途径及基因表达参与调节的复杂病理生理过程。研究表明，长期兴奋 β AR 可以导致病理性心肌肥厚的发生^[7,8]，然而其机制尚不明确。本研究每天给予 Wistar 大鼠腹腔注射 3 mg/kg ISO，连续 2 周，成功制作了 ISO 诱导的心肌肥厚模型。结果显示 ISO 处理大鼠 HW/BW 比值增加，HE 染色显示心肌细胞横截面积明显增大。

CaMKII 是 β AR 下游已知的靶蛋白，是一种普遍存在于哺乳动物细胞中的丝氨酸/苏氨酸激酶，由 α 、 β 、 γ 、 δ 四种不同的表达基因编码形成的 6~12 个亚基多聚体^[9]。CaMKII α 和 CaMKII β 主要存在于神经组织中，CaMKII γ 、 δ 分布广泛，心肌中主要表达 CaMKII δ 。以往研究表明：心肌肥厚患者心肌组织 CaMKII 的活性和表达增加；SHR、主动脉结扎诱导以及转基因动物心肌肥厚模型的心肌，亦发现 CaMKII 表达增加^[1,10]。本实验结果显示，ISO 组与 CTRL 组相比有活性的 p-CaMKII 表达显著增加，提示 CaMKII 参与了 β AR 持久激动诱发心肌肥厚的机制。 β AR 可以通过两条途径激活 CaMKII：一是 cAMP/PKA 的激活，通过 Ca^{2+} /CaM 激活 CaMKII^[11,12]；二是通过 G-蛋白偶联受体激酶 (G protein-coupled receptor kinase, GRK) 磷酸化 β AR，随后膜转位的 β -arrestin 使经典的 cAMP/PKA 信号脱敏并激活 CaMKII^[12] 的非 Ca^{2+} /CaM 依赖性机制。有必要对 CaMKII 激活相关的上下游信号进行进一步研究。

以往研究表明 ROS (主要是 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2) 参与心肌肥厚和心衰的发生发展过程^[2,14]，但其机制尚不明确。心肌 ROS 有两个主要来源：线粒体和 NADPH 氧化酶^[15]。有报道 AngII 可以激活 NADPH 氧化酶，促使线粒体产生过剩 ROS，在高血压及心肌肥厚的发生机制中起重要作用^[16]。NADPH 氧化酶家族 (NOXs) 主要包括 NOX₁₋₅、Duox₁ 和 Duox₂，NOX₄ 是 NOXs 其中一个亚型。NOX₄ 在心肌缺氧、心肌缺血、慢性压力负荷的情况下表达增多^[17,18]。间断激动 β AR 可以使 ROS 生成和 NOX₄ 表达增多^[18-20]。本研究结果表明，ISO 作用两周不仅诱发心肌线粒体 ROS 过度生成，而且诱导心肌组织 NOX₄ 蛋白表达显著增加，提示 ROS 参与了 ISO 诱导心肌肥厚的信号转导，提出了 NADPH 氧化酶依赖和线粒体依赖 ROS 信号均参与了持久激动 β AR

诱导形成心肌肥厚的机制。

最近有研究显示氧化应激信号分子 ROS 可通过直接氧化 M281/282 位点激活 CaMKII^[3]；Howe 等发现用 H₂O₂ 刺激 Jurkat 细胞，CaMKII 可以在无 Ca²⁺ 情况下通过 ROS 介导机制被激活^[21]。我们推测 βAR 介导的心肌肥厚发生机制中，ROS 可能与 CaMKII 激活有关，CaMKII 整合了上游的 ROS 和 Ca²⁺ 信号，作为重要的下游交点信号参与心肌肥厚的发生发展。针对线粒体过氧化物的主要抗氧化防御系统之一是巯基还原系统，NAC 是一种含巯基的抗氧化剂，其既是还原型谷胱甘肽前体，又是 ROS 的直接清除剂，可以透过细胞膜及线粒体膜，故本研究采用 NAC 对 ISO 诱导的大鼠进行实验性抗氧化治疗。研究结果显示：NAC 对正常大鼠心肌无影响，但可以明显改善 ISO 诱发的 HW/BW 及心肌细胞横截面积的增加；NAC 不仅显著降低了 ISO 诱发的线粒体 ROS 过度生成，还有效抑制了 ISO 诱导的心肌 NOX₄ 及 p-CaMKII 表达增加，表明 NAC 不仅可以通过降低氧化应激水平，还可以通过抑制 CaMKII 过表达改善心肌肥厚。在心肌 βAR 持久激动条件下，过度生成的 ROS 也可能通过激活 CaMKII 导致心肌肥厚的发生。ROS 作为上游信号直接调节 CaMKII 的活性尚有待于进一步的体外实验证实。

本研究显示动脉血压在四组大鼠间无明显差异，可能与 ISO 给药时间、给药方式有关。据报道，ISO 腹腔注射给药 2 天后心脏射血分数 (ejection fraction, EF) 升高 27%，而给药 4 天后 EF 下降^[20]，则血压可能保持正常或降低。与此结果一致，本研究测定给药后 7 天、14 天的血压，未能检测到 ISO 诱导的血压升高；此外，肥厚心肌造成左室流出道梗阻，可能导致收缩期鼠尾动脉血压不升高甚至下降。

综上所述，本研究初步证明了氧化应激信号和 CaMKII 在持久激动 βAR 诱发心肌肥厚的机制中起重要作用。NAC 可以通过抑制 NADPH 氧化酶通路及线粒体通路降低 ISO 诱发的氧化应激水平升高，同时下调有活性的 CaMKII 表达，从而有效改善 βAR 介导的病理性心肌肥厚。进一步研究 ROS/CaMKII 信号转导对于寻找病理性心肌肥厚相关治疗靶点具有重要意义。

参考文献

1 Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial

- hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(4): 468–473.
- 2 Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 2007; 49(2): 241–248.
- 3 Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 2009; 133(3): 462–474.
- 4 Gao Q, Pan HY, Qiu S, Lu Y, Bruce Iain C, Luo JH, Xia Q. Atractyloside and 5-hydroxydecanoate block the protective effect of puerarin in isolated rat heart. *Life Sci* 2006; 79(3): 217–224.
- 5 Nie JL (聂金雷), Shi QD, Zhang Y, Li XM, Liu SS. Determination of reactive oxygen species in mitochondria by fluorometric probe. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志) 2002; 18(2): 196–198 (Chinese, English abstract)
- 6 Lu YX (卢永昕). Hypertension: from left ventricular hypertrophy to heart failure. *Chin J Hypertension* (中华高血压杂志) 2007; 15(3): 189–191 (Chinese).
- 7 Communal C, Singh K, Pimentel DR, Pimentel, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998; 98: 1329–1334.
- 8 Bos R, Mougenot N, Findji L, Médiani O, Vanhoutte PM, Lechat P. Inhibition of catecholamine-induced cardiac fibrosis by an aldosterone antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 8–13.
- 9 Maier LS. Role of CaMKII for signaling and regulation in heart. *Front Biosci* 2009; 14: 486–496.
- 10 Ling HY, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng HQ, Gu YS, Dalton ND, Peterson KK, Chen J, Bers D, Brown JH. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(5): 1230–1240.
- 11 Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang DM, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng HP, Xiao RP. Linkage of beta(1)-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* 2003; 111(5): 617–625.
- 12 Zhang M, Han QD, Xiao RP. Distinct β-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2004; 56(1): 1–15.
- 13 Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA. Beta-arrestin-dependent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 2010; 189(3):

- 573–587.
- 14 Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007; 93(8): 903–907.
- 15 Nabeebaccus A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases and cardiac remodelling. *Heart Fail Rev* 2011; 16(1): 5–12.
- 16 de Cavanagh EM, Ferder M, Insera F, Ferder L. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(3): H550–H558.
- 17 Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T, Sadoshima J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(3): 408–416.
- 18 Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu CX, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 2011; 106(7): 1253–1264.
- 19 Xu Q, Dalic A, Fang L, Kiriazis H, Ritchie RH, Sim K, Gao XM, G Drummond G, Sarwar M, Zhang YY, Dart, Du XJ. Myocardial oxidative stress contributes to transgenic beta-adrenoceptor activation-induced cardiomyopathy and heart failure. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 1012–1028.
- 20 Ma XW, Song Y, Chen C, Fu YN, Shen Q, Li ZJ, Zhang YY. Distinct actions of intermittent and sustained β -adrenoceptor stimulation on cardiac remodeling. *Sci China Life Sci* 2011; 54(6): 493–501.
- 21 Howe CJ, Lahair MM, McCubrey JA, Franklin RA. Redox regulation of the calcium/calmodulin dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2004; 279: 44573–44581.